



(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Numéro de publication: 0 416 983 A1

(12)

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

(21) Numéro de dépôt: 90402395.9

(51) Int. Cl. 5: A61K 35/16

(22) Date de dépôt: 30.08.90

(30) Priorité: 05.09.89 FR 8911567

(43) Date de publication de la demande:
13.03.91 Bulletin 91/11

(84) Etats contractants désignés:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Demandeur: CENTRE REGIONAL DE
TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE
19-21 rue Camille Guérin
F-59012 Lille(FR)

(72) Inventeur: Burnouf-Radosevich, Miryana
5, rue du Docteur Schaffner
F-59136 Wavrin(FR)
Inventeur: Burnouf Thierry
5, rue du Docteur Schaffner
F-59136 Wavrin(FR)

(74) Mandataire: Lhuillier, René et al
ARMENTGAUD JEUNE CABINET LEPEUDRY 6,
rue du Fg. St-Honoré
F-75008 Paris(FR)

(54) Procédé de préparation de concentré du complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand de la coagulation sanguine à partir de plasma total.

(57) L'invention concerne un procédé de préparation d'un concentré de complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand à haute activité spécifique à partir de plasma total (non cryoprecipité).

Le procédé comprend une prépurification par un double traitement au chlorure de baryum et à l'hydroxyde d'aluminium.

Le procédé comprend ensuite une purification par chromatographie sur résine échangeuse d'anions, de type DEAE-Fractogel.

Le procédé comprend une étape d'inactivation virale par un traitement au solvant-détergent.

Le procédé permet également de récupérer du fibrinogène, de l'albumine, des immunoglobulines, de l'antithrombine III, de la fibronectine et du complexe prothrombinique, à partir du même plasma.

Les différents concentrés obtenus par le procédé de l'invention sont destinés notamment à un usage thérapeutique.

EP 0 416 983 A1

**PROCÉDÉ DE PRÉPARATION DE CONCENTRÉ DU COMPLEXE FACTEUR VIII-FACTEUR VON WILLEBRAND
DE LA COAGULATION SANGUINE À PARTIR DE PLASMA TOTAL.**

L'invention concerne un procédé de préparation d'un concentré du complexe Facteur VIII - facteur von Willebrand à haute activité spécifique à partir du plasma sanguin total.

Le traitement de l'hémophilie A par l'injection de Facteur VIII est couramment pratiqué et nécessite l'utilisation de préparations de haute pureté, d'une part pour réduire les risques de contamination virale, d'autre part parce que les injections doivent être souvent répétées et que tout excès de matériel contaminant pourrait déclencher des réactions immunitaires indésirables et dangereuses pour le patient.

Plusieurs méthodes sont déjà utilisées dans les centres industriels de traitement du plasma humain pour purifier le Facteur VIII. Ces méthodes comprennent des précipitations des protéines contaminantes par divers agents chimiques, des chromatographies de tamisage moléculaire, des chromatographies d'immunoaffinité, des chromatographies d'échange d'ions et diverses combinaisons de ces différentes méthodes.

Le Facteur VIII étant présent en faible quantité dans le plasma, le rendement des procédés de purification est le principal problème à résoudre. En outre le Facteur VIII est une protéine instable et qui peut être activée par d'autres facteurs sanguins or à l'état activé il perd son intérêt thérapeutique ; les procédés de purification et de dosage final doivent donc être adaptés à ce problème.

La Demandereuse a déjà mis au point une méthode de purification par chromatographie d'échange d'ions qui a été décrite dans la demande de brevet français 88 07530 et qui permet d'obtenir un concentré de Facteur VIII de haute pureté.

Toutefois dans ce procédé, comme dans ceux utilisés par d'autres producteurs, on utilise comme matériau de départ une fraction cryoprécipitée du plasma. Cette étape de cryoprécipitation cause une perte de 30 à 40 % du Facteur VIII qui reste dans le surnageant.

Il serait donc avantageux de mettre au point un procédé de préparation à partir du plasma total non cryoprécipité pour limiter les pertes en Facteur VIII. En outre un tel procédé représenterait une simplification très avantageuse pour des centres de production mal équipés où la cryoprécipitation peut être difficile à réaliser.

C'est pourquoi la Demandereuse a mis au point un procédé simple de purification du Facteur VIII à partir du plasma total qui assure l'obtention d'un concentré de haute pureté et stable, avec un très bon rendement.

L'invention concerne donc un procédé de préparation d'un concentré de Facteur VIII à partir d'un plasma total, procédé qui comprend une prépurification destinée à éliminer les constituants du complexe prothrombinique (Facteurs II, VII, IX, X) et une purification par chromatographie d'échange d'anions qui, par le choix du gel et du tampon d'éluition permet d'obtenir un concentré du complexe Facteur VIII -facteur von Willebrand de haute pureté.

Le procédé permet également d'obtenir, après une étape de purification supplémentaire, des solutions purifiées des autres protéines du plasma comme le fibrinogène, la fibronectine, l'albumine, les immunoglobulines et l'antithrombine III.

Le procédé a été mis au point sur du plasma humain mais il est également applicable à un plasma d'origine animale.

Le procédé selon la présente invention permet donc d'utiliser comme matériau de départ un plasma total, c'est à dire un plasma frais ou congelé pour sa conservation, mais non cryoprécipité. Ce plasma aura été avantageusement récolté en présence de solution anticoagulante ou de stabilisant. Classiquement on utilise un mélange citrate-dextrose-phosphate ; tout stabilisant spécifique du Facteur VIII pourra avantageusement y être ajouté ou substitué.

Comme solution stabilisante du plasma de départ on utilisera avantageusement un mélange d'héparine à 0,2 à 2 U/ml, d'EDTA à 1 à 5 mM, de CaCl₂ 1 à 10 mM, éventuellement additionné de glucose à une concentration comprise entre 5 et 60 g/l.

Le procédé selon la présente invention comprend une première étape de prépurification qui combine une précipitation au chlorure de baryum et une adsorption sur gel d'hydroxyde d'aluminium.

Le traitement au chlorure de baryum est avantageusement réalisé sur le plasma dont le pH est ajusté à 6,5, par addition d'une solution 1 M en chlorure de baryum jusqu'à obtention d'une concentration finale de 0,08 M, sous agitation, et est suivi d'une centrifugation à 5 ° à 10 ° C destinée à éliminer les protéines précipitées, puis de la récupération du surnageant. Les protéines précipitées pourront avantageusement être récupérées pour la production du complexe prothrombinique ou de ses constituants.

Le surnageant est ensuite mis en présence de gel d'hydroxyde d'aluminium à 3 %, à pH 6,5, qui adsorbe les protéines contaminantes résiduelles ; ce traitement est suivi d'un refroidissement à 5 ° à 8 ° C en cryostat, d'une centrifugation à 5 ° C et de

la récupération du surnageant, qui est maintenu à 5° à 8° C.

Ce surnageant doit subir un dessalage qui peut être effectué soit par ultrafiltration en présence du tampon d'équilibrage de la chromatographie suivante additionné d'héparine à 0,5 à 2 U/ml, soit par chromatographie sur Sephadex G25 dans le même tampon.

Le procédé selon la présente invention comprend ensuite une séparation par chromatographie d'échange d'anions. La Demanderesse a déjà décrit dans la demande de brevet français 88 07530, les avantages qu'elle a mis en évidence d'un type de résine qui offre un faible pouvoir d'échange ionique et qui présente des pores de grande dimension, ceux-ci permettant la rétention de molécules de très grande taille. Cette rétention prolongée permet l'établissement de liaisons de caractère faiblement hydrophobe avec la résine et le choix de la force ionique du tampon permet une désorption sélective des molécules fixées.

Des résines de ce type sont disponibles dans le commerce sous l'appellation générique Fractogel. On peut ainsi utiliser le DEAE-Fractogel 650 (M) et le T- ou D-MAE-Fractogel (Merck). Ces mêmes résines sont actuellement disponibles sous une forme qualifiée par le fournisseur de "résines de type tentaculaire". La structure de leur matrice est modifiée afin d'augmenter la surface de fixation des charges positives ce qui peut favoriser une augmentation de la capacité du gel.

Le tampon d'équilibrage de la chromatographie est un tampon à base de citrate de sodium et de chlorure de sodium, ajusté à pH 7, qui contient avantageusement du chlorure de calcium à une concentration comprise entre 0,5 et 6 mM et de la lysine à une concentration de l'ordre de 2 à 4 g/l et du glycocolle à une concentration de 8 à 11 g/l. La mise en oeuvre du procédé comprendra des augmentations définies de cette concentration en chlorure de sodium.

La mise en oeuvre du procédé de purification selon l'invention comprend l'injection de la préparation prépurifiée décrite plus haut sur la colonne de chromatographie. Dans les conditions définies (0,11 M NaCl), la colonne peut fixer les molécules de très grande taille comme le complexe facteur von Willebrand-Facteur VIII et laisse passer dans le filtrat le fibrinogène, l'albumine, les immunoglobulines, l'antithrombine III et la fibronectine.

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention qui vise à obtenir le meilleur rendement de récupération du Facteur VIII, la force ionique du tampon d'élution de la chromatographie est augmentée une seule fois, à 0,27 M de chlorure de sodium. Selon un autre mode de réalisation de l'invention cette élution est précédée par un prélavage par augmentation de la force ionique à 0,13

M de chlorure de sodium, ce qui élimine la fibronectine.

Le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand désorbé et élue dans ces conditions présente une activité spécifique au moins égale à 5 à 10 U/mg. Le rendement global du procédé est au moins égal à 350 U/litre de plasma initial et peut être au moins égal à 500 U/litre quand le plasma initial est additionné du mélange stabilisant décrit plus haut.

En fonction de son utilisation ultérieure, cette solution de complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand peut encore être soumise à une étape supplémentaire de purification et particulièrement de concentration par une nouvelle chromatographie. Celle-ci pourra être effectuée, comme la précédente, sur DEAE- ou T/D-MAE-Fractogel ou sur d'autres résines; d'autres supports comme le sulfate de dextran, l'amino-hexyl immobilisé, l'héparine immobilisée, les résines de sulfopropyle, d'affinité ou d'immunoaffinité peuvent aussi être utilisés.

Cette chromatographie supplémentaire est effectuée dans le même tampon de base que la précédente. Selon un mode de réalisation préféré de l'invention qui vise à obtenir du Facteur VIII le plus concentré possible, cette chromatographie supplémentaire est effectuée dans les mêmes conditions que la première, c'est-à-dire avec une seule étape de désorption par augmentation de la force ionique du tampon à 0,27 M NaCl. Selon un autre mode de réalisation de l'invention, par une première augmentation de la force ionique du tampon à 0,13 M on élimine les protéines contaminantes résiduelles et par une seconde augmentation à 0,27 M on récupère le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand concentré de haute pureté, qui présente alors une activité spécifique au moins égale à 10 à 20 U/mg.

Les autres protéines du premier filtrat de la colonne comme les immunoglobulines, l'albumine, l'antithrombine III, le fibrinogène et la fibronectine peuvent également être purifiées et concentrées par des méthodes chromatographiques classiques.

Le procédé selon la présente invention comprend également un traitement d'inactivation virale selon une technique connue. Dans le cas où on utilise un agent chimique, par exemple un traitement par solvant-détergent, il sera judicieux d'effectuer ce traitement avant l'une quelconque des étapes chromatographiques pour que celle-ci assure l'élimination des agents d'inactivation.

Les concentrés du complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand et des autres protéines plasmatiques obtenus par le procédé décrit sont aussi l'objet de la présente invention.

Lesdits concentrés sont conditionnés selon les normes de la pharmacopée et peuvent être destinés à un usage thérapeutique.

Les exemples suivants illustrent deux modes

de réalisation de l'invention sans toutefois en limiter la portée.

EXEMPLE 1

On utilise 250 ml de plasma frais ou congelé-décongelé à 22-25 °C, récolté en présence d'anticoagulant/stabilisant (citrate-dextrose-phosphate, par exemple), et ajusté à un pH de 6,5 par de l'acide acétique.

a) Prépurification

On y ajoute 20 ml de chlorure de baryum 1 M à pH 6,5 au moyen d'une pompe péristaltique jusqu'à obtention d'une concentration finale de 0,08 M. L'addition se fait à un débit de 4 à 8 ml par minute puis le mélange est laissé sous agitation, à température ordinaire, pendant 15 minutes.

Le mélange est ensuite centrifugé à 2.700 tours/minute pendant 20 minutes, à 8 °C, puis le surnageant est récupéré.

Le surnageant est ensuite adsorbé sur un gel d'hydroxyde d'aluminium (Alhydrogel Eurobio à 3 % d'Al(OH)₃) à raison de 2,3 g/l de plasma. Le pH est ajusté à 6,5 et la température est abaissée jusqu'à 5 °C en cryostat. Le mélange est centrifugé à 5 °C à 2700 tours/minute pendant 20 minutes et le surnageant est récupéré et maintenu à 5 °C.

Ce traitement permet l'élimination des composants du complexe prothrombinique (Facteurs II, VII, IX, X) qui peuvent être récupérés et purifiés selon des procédés connus.

On obtient des résultats particulièrement satisfaisants par la combinaison de ces deux traitements, alors qu'un traitement à l'alhydrogel seul ne permet pas d'éliminer complètement la prothrombine et les autres composants du PPSB et qu'un traitement au chlorure de baryum seul laisse subsister du Facteur X, de la prothrombine et surtout du Facteur VII.

Le surnageant récolté est dessalé soit par ultrafiltration en présence du tampon de la chromatographie suivante (voir plus bas) additionné de 1 U/ml d'héparine, soit par chromatographie sur Sephadex G25, dans le même tampon.

Un traitement d'inactivation virale classique au solvant-détergent est ensuite appliqué, pendant 6 heures à 24 °C (Cette méthode de traitement a été décrite dans la demande de brevet européen n° 0 131 740).

b) Purification par chromatographie

Le surnageant prépurifié et dialysé est soumis

à une étape de purification par chromatographie. On utilise une colonne K26/30 (Pharmacia-Uppsala-Suède) d'un diamètre de 2,6 cm et d'une hauteur utile de 30 cm, remplie sur 10 cm par la résine DEAE-Fractogel-TSK 650(M) (Merck).

Le tampon d'équilibrage de la colonne et de charge de l'échantillon a la composition suivante : citrate de sodium 10 mM, chlorure de calcium 1 mM, glycocolle 9 g/l, lysine 3 g/l. Ce tampon est additionné de chlorure de sodium, ajusté à une concentration finale de 0,11 M et à un pH de 7. L'échantillon est injecté sur la colonne à un débit de 100 ml/h.

La colonne est lavée avec le tampon d'équilibrage pour éliminer les protéines non adsorbées, qui comprennent le fibrinogène, l'albumine, les immunoglobulines, l'antithrombine III et la fibronectine ainsi que les agents d'inactivation virale.

Le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand est ensuite désorbé par augmentation de la force ionique du tampon à 0,27 M de chlorure de sodium.

La solution de Facteur VIII obtenue par ce procédé présente une activité spécifique de 5 à 10 UI/mg et le rendement de la purification par rapport au plasma injecté sur la colonne est de 60 à 80 %.

On observe toujours un rapport proche de 1U/1U pour la concentration des deux facteurs VIII et von Willebrand, ce dernier étant exprimé en unités de cofacteur de la ristocétine.

La pureté de cette solution de Facteur VIII peut encore être légèrement améliorée par une étape supplémentaire de séparation chromatographique qui permet de concentrer le produit. On utilise par exemple une seconde colonne de DEAE-Fractogel, dans les mêmes conditions de charge que précédemment, et on effectue un prélavage à 0,13 M de NaCl, ce qui élimine les protéines contaminantes résiduelles. La force ionique du tampon est ensuite augmentée à 0,27 M de chlorure de sodium pour désorber et éluer le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand hautement purifié et concentré.

La deuxième étape de concentration par chromatographie peut être remplacée par une ultrafiltration.

Selon le mode de réalisation habituel de la présente invention, la première purification par chromatographie est réalisée sur une résine de DEAE-Fractogel. Toutefois de très bons résultats ont également été obtenus avec les nouvelles résines commercialisées par Merck, comme le TMAE-Fractogel (TMAE = Tri. Methyl. Amino. Ethyl) ou le DMAE-Fractogel (DMAE = Di-MAE), qui présentent des propriétés équivalentes à celles du DEAE-Fractogel. On peut également utiliser les nouvelles résines de type "tentaculaire" mises au point par la société Merck et présentées par W. Müller à la "Conference on Liquid chromatography", juin 1989.

à Stockholm.

EXEMPLE 2

Un autre mode de réalisation de la présente invention permet également de préparer des concentrés de fibrinogène et de fibronectine tout en fournissant un Facteur VIII-facteur von Willebrand concentré avec un rendement plus faible et une activité spécifique légèrement améliorée.

Le procédé est identique à celui de l'exemple 1 jusqu'à l'éluition du Facteur VIII-facteur von Willebrand de la première colonne de DEAE-Fractogel.

Le fibrinogène, l'antithrombine III, l'albumine et les immunoglobulines ne sont pas retenus par la colonne et peuvent être récupérés dans le filtrat.

Le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand peut être purifié et concentré par une deuxième séparation chromatographique sur une colonne de DEAE-Fractogel, avec le tampon d'équilibrage à une force ionique de 0,17 M de chlorure de sodium pour ne pas fixer des protéines contaminantes résiduelles ; une augmentation de la force ionique à 0,27 M de chlorure de sodium permet de désorber et éluer le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand. On obtient ainsi une activité spécifique de 10 à 20 IU/mg.

Le fibrinogène et la fibronectine peuvent ensuite être purifiés et concentrés, selon des méthodes chromatographiques connues, pour donner des solutions d'une qualité conforme pour un usage thérapeutique et qui ont été décrites dans la demande de brevet français n° 88 07530.

Les autres protéines du plasma peuvent être purifiées-concentrées selon des méthodes classiques de fractionnement.

EXEMPLE 3

On peut encore améliorer le rendement de la purification en stabilisant le plasma de départ, dès sa décongélation à 25 °C, par l'addition du mélange suivant :

héparine 1 U/ml

EDTA 2 mM, soit 0,74 g/l

chlorure de calcium 6 mM, soit 0,67 g/l

On peut encore ajouter à ce mélange du glucose à une concentration comprise entre 5 et 60 g/l.

Le pH est ensuite abaissé à 6,5 par l'addition d'acide acétique.

Les étapes de purifications sont ensuite appliquées comme dans l'exemple 1 ou 2.

Dans ces conditions, le rendement global du procédé de purification est au-moins égal à 500 U de FVIII:C/litre de plasma initial.

Ceci correspond à une récupération globale de

55 à 65% de l'activité de Facteur VIII pour une activité spécifique comprise entre 10 et 30 unités de FVIII:C/mg de protéine.

5

Revendications

- 10 1.- Procédé de préparation d'un concentré de Facteur VIII-facteur von Willebrand stable et à haute activité spécifique caractérisé en ce qu'on soumet un plasma total à une prépurification par un double traitement au chlorure de baryum et à l'hydroxyde d'aluminium et à une purification par chromatographie sur un gel échangeur d'anions permettant la rétention de molécules de très grande taille.
- 15 2.- Procédé selon la revendication 1 caractérisé en ce que le plasma total est un plasma frais ou congelé.
- 20 3 - Procédé selon la revendication 1 ou 2 caractérisé en ce que le plasma est additionné d'un mélange stabilisant comprenant de l'héparine à 0,2 à 2 U/ml, de l'EDTA à 1 à 5 mM et du CaCl₂ à 1 à 10 mM.
- 25 4 - Procédé selon la revendication 3, caractérisé en ce que le mélange stabilisant comprend, en outre du glucose à une concentration comprise entre 5 et 60 g/l.
- 30 5 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4 caractérisé en ce que la prépurification comprend :
 - a) une précipitation au chlorure de baryum suivie d'une centrifugation et de la récupération du surnageant,
 - b) une adsorption sur gel d'hydroxyde d'aluminium suivie d'une centrifugation à froid et de la récupération du surnageant,
 - c) un traitement de dessalage.
- 35 6- Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que la précipitation au chlorure de baryum est effectuée par addition d'une solution de chlorure de baryum 1 M à pH 6,5, sous agitation, et est suivie d'une centrifugation à 5 à 10 °C et de la récupération du surnageant.
- 40 7.- Procédé selon la revendication 5 ou 6 caractérisé en ce que l'adsorption sur gel d'hydroxyde d'aluminium est réalisée avec un gel à 3%, à un pH de 6,5 et est suivie d'un refroidissement rapide à 5 °C, d'une centrifugation à 5 °C et de la récupération du surnageant.
- 45 8.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que le traitement de dessalage est effectué par ultrafiltration en présence du tampon d'équilibrage de la chromatographie suivante, additionné d'héparine.
- 50 9.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 à 7 caractérisé en ce que le traitement de dessalage est effectué par chromatographie sur colonne de Séphadex G 25, en tampon d'équilibrage

ge de la chromatographie suivante, additionné d'héparine.

10 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9 caractérisé en ce que le surnageant du plasma ayant subi une prépurification est injecté sur une colonne de chromatographie renfermant un gel échangeur d'anions qui n'exclut pas les molécules de très grande taille et laisse passer dans le filtrat le fibrinogène, l'albumine, les immunoglobulines, l'antithrombine III et la fibronectine.

11 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 10 caractérisé en ce que le gel de chromatographie est un gel de type polymère vinylique greffé de groupements de type DEAE ou T- ou D-MAE.

12.- Procédé selon la revendication 11 caractérisé en ce que le gel de polymère est du Fractogel.

13.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 12 caractérisé en ce que le tampon d'équilibrage de la chromatographie est un tampon à base de citrate de sodium et de chlorure de calcium, qui contient du glycocolle et de la lysine, qui est additionné de chlorure de sodium 0,11 M et est ajusté à pH 7.

14.- Procédé selon la revendication 13 caractérisé en ce que le tampon contient 8 à 11 g/l de glycocolle et 2 à 4 g/l de lysine.

15.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 caractérisé en ce que la force ionique du tampon est augmentée à 0,27 M de chlorure de sodium pour désorber le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand de la colonne de chromatographie.

16.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 caractérisé en ce que la force ionique du tampon est augmentée à 0,13 M de chlorure de sodium ce qui élimine la fibronectine puis à 0,27 M de chlorure de sodium pour désorber le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand de la colonne de chromatographie.

17 - Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 caractérisé en ce que le complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand désorbé de la colonne de chromatographie est soumis à une étape supplémentaire de purification-concentration par chromatographie.

18.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 caractérisé en ce que la chromatographie supplémentaire est effectuée sur une résine échangeuse d'ions choisie parmi le DEAE- ou T/D-MAE-Fractogel, l'amino-hexyl immobilisé, l'héparine immobilisée, le sulfate de dextran, le sulfo-propyle, ou sur résine d'affinité ou d'immunoaffinité.

19 - Procédé selon la revendication 17 ou 18 caractérisé en ce que la chromatographie supplémentaire est effectuée en tampon ajusté à 0,11 M de chlorure de sodium et comprend 2 augmenta-

tions successives de la force ionique à 0,13 M puis à 0,27 M.

20.- Procédé selon la revendication 17 ou 18 caractérisé en ce que la chromatographie supplémentaire est effectuée en tampon ajusté à 0,17 M de chlorure de sodium et comprend une seule augmentation de la force ionique à 0,27 M.

21.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce que les protéines du filtrat de la chromatographie selon la revendication 10, sont soumises à une étape supplémentaire de purification-concentration.

22.- Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 21 caractérisé en ce qu'on effectue un traitement classique d'inactivation virale par solvant-détergent avant l'une quelconque des étapes de chromatographie.

23.- Concentré de complexe Facteur VIII-facteur von Willebrand caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 22.

24.- Concentrés de protéines dérivées du plasma caractérisés en ce qu'ils sont obtenus par un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 et 21 ou 22.

25.- Concentrés selon la revendication 23 ou 24 caractérisés en ce qu'ils sont conditionnés pour un usage thérapeutique.

30

35

40

45

50

55



EP 90 40 2395

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS			
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	Revendication concernée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. Cl.5)
X, P, D	EP-A-359593 (CENTRE REGIONAL DE TRANSFUSION SANGUINE DE LILLE) * le document en entier * ---	1-25	A61K35/16
A	FR-A-2184898 (BAXTER LABORATORIES). * page 4 * ---	1-25	
A	US-A-4435318 (PABST P.L. ET AL) * colonne 4 * ---	1-25	
A	US-A-4386068 (MITRA G. ET AL) * colonne 1 * ---	1-25	
A	EP-A-104356 (THE UNIVERSITY OF ROCHESTER) * page 7 * ---	1-25	
A	EP-A-53046 (ROCK G.A.) * revendications 1-6 * ---	1-25	
A	EP-A-176926 (MILES LABORATORIES) * le document en entier * -----	1-25	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. Cl.5)
			A61K
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications			
Lieu de la recherche	Date d'achèvement de la recherche		Examinateur
BERLIN	17 OCTOBRE 1990		AVEDIKIAN P. F.
CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande I : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			